

⑨ 日本国特許庁(JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報(A) 昭62-21062

⑫ Int. Cl. 4

G 01 N 33/50
 C 12 Q 1/00
 G 01 N 33/58

識別記号

庁内整理番号

P-8305-2G
 8213-4B
 8305-2G

⑬ 公開 昭和62年(1987)1月29日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全18頁)

⑭ 発明の名称 標的ヌクレオチド配列アッセイのための方法、キットおよび試薬複合体

⑮ 特 願 昭61-144666

⑯ 出 願 昭61(1986)6月20日

優先権主張 ⑰ 1985年7月17日 ⑱ 米国(U S) ⑲ 755898

⑳ 発 明 者 カルヴィン・バーディ アメリカ合衆国ニュージャージー州07830, カリフオン,
 ー・フル・バリー ボックス 54, アールアール 3
 ㉑ 出 願 人 アライド・コーポレー アメリカ合衆国ニュージャージー州モリス・カウンテ
 ション イ, モリス・タウンシップ, コロンビア・ロード・アン
 ド・パーク・アベニュー (番地なし)
 ㉒ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名

明 細 書

1. [発明の名称]

標的ヌクレオチド配列アッセイのための方法、
 キットおよび試薬複合体

2. [特許請求の範囲]

(1) (a) (i) プリン/ピリミジン塩基の水素結合を介して DNA 標的ヌクレオチド配列に塩基対結合しうるプローブポリヌクレオチド、および(ii) プリン/ピリミジン塩基対の水素結合を介して、プローブポリヌクレオチドが DNA 標的ヌクレオチド配列に結合しうる領域と少なくとも一部は共通である領域のプローブポリヌクレオチドに塩基対結合した RNA 信号標ポリヌクレオチドの試薬複合体を供給し;

(b) 該試薬複合体を、DNA 標的ヌクレオチド配列が存在する場合これがプローブポリヌクレオチドに結合し、RNA 信号標ポリヌクレオチドを試薬複合体から置換する条件下で試料と接触させ;

(c) 置換された RNA 信号標ポリヌクレオチド

を分離することなく、試薬複合体中に残存する RNA 信号標ポリヌクレオチドに対して選択的に消化し、そして;

(d) 置換された RNA 信号標ポリヌクレオチドの消化による消化生成物の存在を検出する工程よりなる、生物学的試料の DNA 中における標的ヌクレオチド配列の存在を調べる方法。

(2) 検出工程(d)が消化工程(c)で生成したアブノリン酸類の存在および量と関係関係にある量の検出可能な酵素反応生成物を重畳する酵素反応系を供給することよりなる、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) 接触工程(b)、消化工程(c)および検出工程(d)がすべて溶液中で、中間の分離なしに行われる、特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(4) RNA 信号標ポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが試薬複合体中においてプローブポリヌクレオチドのヌクレオチドに結合し、プローブヌクレオチドが未結合の3'末端ポリヌクレオチドを含まず; かつ

特開昭62-21062(2)

消化工程(c)がリボヌクレオチド類を一本鎖3'末端から前進的に消化することよりなる、特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(5) プローブポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである、特許請求の範囲第4項に記載の方法。

(6) プローブポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドがリボヌクレオチドであり、試薬複合体中においてRNA信号鎖ポリヌクレオチドのヌクレオチドに結合している、特許請求の範囲第4項に記載の方法。

(7) 検出工程(d)がリボヌクレオチド類を一本鎖3'末端から前進的にポリヌクレオチドホスホリラーゼおよび無機ホスフェートにより消化することよりなり、検出工程(d)がリボヌクレオチドニリン酸類のうちアデノシンニリン酸(ADP)をリン酸化してアデノシン三リン酸(ATP)にすることよりなる、特許請求の範囲第1項ないし第6項のいずれかに記載の方法。

(8) ADPをリン酸化する工程において過剰の有

合しうるプローブポリヌクレオチド、および(III)プリン/ピリミジン塩基対の水素結合を介して、プローブポリヌクレオチドがDNA鎖的ヌクレオチド配列に結合しうる領域と少なくとも一部は共通である領域のプローブポリヌクレオチドに塩基対結合したRNA信号鎖ポリヌクレオチドの試薬複合体であつて、RNA信号鎖ポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが試薬複合体中においてプローブポリヌクレオチドのヌクレオチドに結合しており、かつプローブポリヌクレオチドが3'-水酸基を有する未結合3'末端リボヌクレオチドを含まないもの；

(a) 一本鎖状の3'末端リボヌクレオチドに特異的な消化酵素；

(c) 消化酵素により生成したアデノシンニリン酸類をATPに変換するのに有効な反応体および酵素、ならびに

(d) ATP、またはアデノシンニリン酸類からATPへの転化の微生物を検出するための手段、からなる、生物学的試料のDNA中のあらかじめ

検出ホスフェート化合物を使用し、かつADPおよび有機ホスフェート化合物からのATPの産生を触媒するのに有効なキナーゼ酵素を使用する、特許請求の範囲第7項に記載の方法。

(8) 過剰の有機ホスフェート化合物およびキナーゼ酵素が消化工程(c)において反応混合物中に存在し、これにより消化工程(c)がADPリン酸化工程により終結に向けて駆動される、特許請求の範囲第8項に記載の方法。

(10) 信号鎖ポリヌクレオチドとプローブポリヌクレオチドの二重らせんがDNA/RNA二重らせんセグメントであり、消化工程(c)において一本鎖ポリリボヌクレオチドセグメントを消化してリボヌクレオチドリノ酸類にする第1消化酵素、およびRNA/RNA二重らせんセグメントのホスホジエステル結合を選択的に開裂して3'ヒドロキサン末端を生じる第2消化酵素を使用することよりなる、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

(11) (a) (I)プリン/ピリミジン塩基の水素結合を介してDNA鎖的ヌクレオチド配列に塩基対結

定められた標的ヌクレオチド配列の存在を測定するためのキット。

(12) 消化酵素がポリヌクレオチドホスホリラーゼであり、キットがさらに無機ホスフェートを含み、従つて消化酵素により生成するアデノシンニリン酸類がヌクレオチドニリン酸類である、特許請求の範囲第11項に記載のキット。

(13) 反応体および酵素(c)が有機ホスフェート化合物およびADPからATPを産生するのに有効な過剰の有機ホスフェート化合物およびキナーゼ酵素からなる、特許請求の範囲第12項に記載のキット。

(14) ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、有機ホスフェート化合物およびキナーゼ酵素が一緒に包装されている、特許請求の範囲第13項に記載のキット。

(15) プローブポリヌクレオチドがDNAである、特許請求の範囲第11項ないし第14項のいずれかに記載のキット。

(16) さらにRNA/RNA二重らせんセグメント中

特開昭62-21062(3)

のリボヌクレオチドホスホジエステル結合に特異的な第2の消化酵素を含む、特許請求の範囲第15項に記載のキット。

(1) プリン/ピリミジン塩基の水素結合を介してDNA標的ヌクレオチド配列に塩基対結合しうるプローブポリヌクレオチド、および

(2) プリン/ピリミジン塩基対の水素結合を介して、プローブポリヌクレオチドがDNA標的ヌクレオチド配列に結合しうる領域と少なくとも一部は共通である領域のプローブポリヌクレオチドに塩基対結合したRNA信号領ポリヌクレオチド

からなる試薬複合体であつて；

RNA信号領ポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが試薬複合体においてプローブポリヌクレオチドのヌクレオチドに結合しており；かつ

プローブポリヌクレオチドが3'-水酸基を有する未結合3'末端リボヌクレオチドを含まない試薬複合体。

オチドの標的結合領域に結合し、信号領を試薬複合体から置換する。置換された信号領を次いで検出する。これは一般に分離工程後に行われ、この工程には多くの場合試料が導入される前に固体支持体に固定されたか、または置換工程後に固体支持体に固定されたプローブポリヌクレオチドが関与する。均質な様式で（分離工程なしに）実施しうる具体例はごくわずかに示されているにすぎない。

この種の置換アッセイ法は米国特許第4,358,535号（ファルコウら、1982年）に代表される従来のハイブリッド形成によるアッセイ法と比べて、試料核酸の固定化に伴う懸念が除かれるという点で種々の利点をもつ（米国特許出願第607,885号明細書）。しかし大部分の読取り（置換された標的ポリヌクレオチドまたは信号領の測定）には分離工程が必要である。

米国特許出願第729,503号明細書（シー・バリーら、1985年5月2日出願）にはポリヌクレオチド置換型の不均質アッセイ法が記載されてお

3. [発明の詳細な説明]

本発明は特に診断を目的とするポリヌクレオチドアッセイ、ならびにこの種のアッセイに用いるキットおよびポリヌクレオチド試薬複合体に関する。

エス・イー・ダイヤモンドらの米国特許出願第607,885号明細書（1984年5月7日出願、アライド・コーポレーションおよびジエネティクス・インスティテュート社共同出願）には、試料核酸の標的ヌクレオチド配列に関するポリヌクレオチド置換アッセイ法が記載されている。この種のアッセイ法においては、プローブポリヌクレオチドは測定すべき標的ヌクレオチド配列に相補的なセグメント（標的結合領域）を含む。第2のポリヌクレオチド（標的ポリヌクレオチドまたは信号領と呼ばれる）が相補的塩基対合によつて標的結合領域の少なくとも一部に結合している。使用に際しては、プローブポリヌクレオチドおよび信号領を含む試薬複合体に試料を添加させる。試料中の標的ヌクレオチド配列がプローブポリヌクレ

オチドの場合置換された信号領（標的ポリヌクレオチド）は特にその3'末端に消化可能なポリリボヌクレオチドセグメントをもつ。標的ヌクレオチド鎖による置換、および分離ののち、この信号領が消化されて（特に酵素ポリヌクレオチドホスホリラーゼにより）リボヌクレオチドリブリン酸（特にニリン酸）となり、こうして生成したアデノシンリン酸（特にアデノシンニリン酸）が測定される。この測定は特にアデノシン三リン酸（ATP）へのリン酸化、およびATPの測定（たとえばルシフェリンを用いるルシフェラーゼ触媒反応による）もしくはリン酸化工程の副生成物の測定（たとえばNADHおよび乳酸デヒドロゲナーゼを用いるビルビン酸測定法）によつて行われる。消化可能なポリリボヌクレオチドセグメントを含む置換された信号領のアッセイに採用できる消化、リン酸化および測定の各工程についてのより詳細な考察に関しては、米国特許出願第729,502号明細書（シー・バリーら）も参照されたい。

均質アッセイ様式で操作される、置換 信号領の

特開昭62-21062(4)

消化および消化生成物アデノシンリン酸の測定により置換型ポリヌクレオチドアッセイ法を行う技術が見出された。従つて本発明は、

(1) (a) (i) プリン/ピリミジン塩基の水素結合を介して DNA 鎖のヌクレオチド配列に塩基対結合しうるプローブポリヌクレオチド、および(ii) プリン/ピリミジン塩基対の水素結合を介して、プローブポリヌクレオチドが DNA 鎖のヌクレオチド配列に結合しうる領域と少なくとも一部は共通である領域のプローブポリヌクレオチドに塩基対結合した RNA 信号鎖ポリヌクレオチドの試薬複合体を供給し、

(4) 該試薬複合体を、DNA 鎖のヌクレオチド配列が存在する場合これがプローブポリヌクレオチドに結合し、RNA 信号鎖ポリヌクレオチドを試薬複合体から置換する条件下で試料と接触させ、

(c) 置換された RNA 信号鎖ポリヌクレオチドを分離することなく、試薬複合体中に残存する RNA 信号鎖ポリヌクレオチドに対して選択的に消化し、そして、

うる領域と少なくとも一部は共通である領域のプローブポリヌクレオチドに塩基対結合した RNA 信号鎖ポリヌクレオチドの試薬複合体であつて、RNA 信号鎖ポリヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドが試薬複合体中においてプローブポリヌクレオチドのヌクレオチドに結合しており、かつプローブポリヌクレオチドが 3'-水酸基を有する未結合の 3' 末端リボヌクレオチドを含まないもの、

(4) 一本鎖状の 3' 末端リボヌクレオチドに特異的な消化酵素、

(c) 消化酵素により生成したアデノシンリン酸類を ATP に変換するのに有効な反応体および酵素ならびに

(4) ATP、またはアデノシンリン酸類から ATP への転化の副生物を検出するための手段からなる、生物学的試料の DNA 中のあらかじめ定められた鎖のヌクレオチド配列の存在を測定するためのキットを提供する。

本発明はさらに、上記プローブポリヌクレオチドおよび上記 RNA 信号鎖ポリヌクレオチドからな

(4) 置換された RNA 信号鎖ポリヌクレオチドの消化による消化生成物の存在を検出する工程よりなる、生物学的試料の DNA 中における鎖のヌクレオチド配列の存在を調べる方法を提供する。

この方法の好ましい形態においては、信号鎖は試薬複合体において鎖の結合領域のヌクレオチドに結合した 3' 末端リボヌクレオチドを含む。これはこのように結合した状態ではポリヌクレオチドホスホリラーゼにより消化されないが、置換されたのちはポリヌクレオチドホスホリラーゼにより消化されて、リボヌクレオシドニリン酸類となる。これにアデノシンニリン酸が含まれ、これが測定される。

本発明は

(a) (i) プリン/ピリミジン塩基の水素結合を介して DNA 鎖のヌクレオチド配列に塩基対結合しうるプローブポリヌクレオチド、および(ii) プリン/ピリミジン塩基対の水素結合を介して、プローブポリヌクレオチドが DNA 鎖のヌクレオチド配列に結合し

る、上記の方法およびキットに用いる試薬複合体をも提供する。

第 1 図は本発明の第 1 の実施態様を 3 部分に分けて (第 1 A、1 B および 1 C 図) 示した略図であり、第 1 A 図には試薬複合体、第 1 B 図には置換工程の中間段階、第 1 C 図には置換された信号鎖の消化および ADP から ATP へのリン酸化を示す。

第 2 A 図は本発明の第 2 の実施態様による試薬複合体の略図である。

第 2 B 図は本発明の第 3 の実施態様による試薬複合体の略図である。

第 2 C 図は本発明の第 4 の実施態様による試薬複合体の略図である。

第 2 D 図は本発明の第 5 の実施態様による試薬複合体の略図である。

第 3 A、3 B、3 C、3 D および 3 E 図は本発明の第 6 の実施態様の各段階を順次示した略図である。

第 4 A 図は本発明の第 7 の実施態様による試薬複合体の略図である。

特開昭62-21062(5)

第4B図は信号鎖（もはや図示されていない）置換後の第4A図の試薬複合体の略図である。

本発明により提供され、本発明の方法およびヤットに用いられる試薬複合体の基本的要素は、プローブポリヌクレオチドおよび信号鎖であり、これらは後記のように相補的塩基対合によつてのみ相互に結合していてもよく、あるいはさらにリン酸/糖ポリヌクレオチド主鎖が共有結合していてもよい（あるいはさらに共有結合または非共有結合していてもよい）。プローブポリヌクレオチドは限定される標的ヌクレオチド配列に相補的な標的結合領域をもつ。米国特許出願第607,885号明細書に詳述されるように、標的結合領域は標的ヌクレオチド配列に完全に相補的であつてもよく、あるいは一定数の不整合を含んでいてもよい。さらに標的結合領域は信号鎖結合領域（または標的ポリヌクレオチド結合領域、従つて図面においてはLBR）と呼ばれる部分に分割されていることが好都合であり、試薬中においてこの部分に信号鎖が相補的塩基対合により結合している。米国特

許第607,885号明細書の第1G図に示されるように、信号鎖の他の少数の塩基が標的結合領域外のプローブポリヌクレオチドの一部（残部結合領域、またはRBR）に結合していてもよいが、このような残部結合領域は存在しないことが好ましい。プローブポリヌクレオチドの標的結合領域中に通常存在する他の部分（単数または複数）は試薬複合体において一本鎖であり、標的ヌクレオチド配列が信号鎖のヌクレオチド置換前にこの領域に最初に結合しうるので初期結合領域（IBR）と呼ばれる。米国特許第607,885号明細書に記載されるように、標的結合領域の大きさは他と無関係に決定されるのではなく、LBRおよびIBRの好ましい長さまたはより好ましい長さの合計と考えることができる。信号鎖結合領域（LBR）は好ましくはヌクレオチド少なくとも25個の長さ、より好ましくはヌクレオチド50~1000個の長さ、最も好ましくはヌクレオチド300~1000個の長さである。初期結合領域は好ましくはヌクレオチド少なくとも20個の長さ、より好ましくはヌクレオ

チド少なくとも500個の長さ、最も好ましくはヌクレオチド約500~約1000個の長さである。信号鎖結合領域（LBR）は標的結合領域（TBR）の一端または一端付近にあつて、単一の連続した初期結合領域（IBR）が信号鎖結合領域（LBR）の一部ではない標的結合領域（TBR）の本質的にすべてであることが好ましい。しかし後記の第2C図に示すように、信号鎖結合領域（LBR）が標的結合領域（TBR）の一端以外の位置にあつてもよく、この場合は初期結合領域が2か所（IBR-1およびIBR-2）存在するであろう。

プローブポリヌクレオチドはDNAまたはRNAであるか、あるいはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの双方であつてもよい（特にブロックポリマー構造の場合）。本発明の場合、アッセイすべき標的ヌクレオチド配列は一般にDNAであつて、RNAではない。試料RNAが存在する場合、これを前処理し（たとえば3'末端を誘導体化することにより）、これらの試料RNAを本発明の後続の消化工程において消化されないものにするができる。本発明の多くの形態の場合の

ようにプローブポリヌクレオチドがDNAである場合、本発明に用いるプローブポリヌクレオチドには米国特許出願第607,885号明細書に記載されたものに比べて何ら特別を拘束はない。プローブポリヌクレオチドがRNAであるか、またはリボヌクレオチドを含むヘテロポリヌクレオチドである場合、プローブポリヌクレオチドのリボヌクレオチドセグメントは、試薬複合体が無傷である限り後記の消化酵素または方法によつて消化されるはならない。たとえばポリヌクレオチドホスホリラーゼその他の構造感受性の前進性酵素（processive enzyme）をこの工程に用いる場合、末端3'-リボヌクレオチドセグメントが試薬複合体において相補的塩基対合によつて結合しているのではない限り、プローブポリヌクレオチドはこのセグメントを含んではならない（含む場合、後記のように、また第3A図および第4A図に示されるように、このセグメントは相補的塩基対合によつて信号鎖のヌクレオチドに結合していることが好ましい）。

本発明の方法、ヤットおよび試薬複合体に用い

特開昭62-21062(6)

られる信号鎖ポリヌクレオチドは少なくともリボヌクレオチドセグメントを含み、RNAであることが好ましい。本発明の重要な特色は、これらのヌクレオチドセグメントがプローブポリヌクレオチドからいつたん置換されると後記の消化酵素または工程によつて消化されうるが、信号鎖が相補的塩基対合によつてプローブポリヌクレオチドに結合したままである限りこれらの酵素または工程によつて消化されてはならないという点である。簡単にするために、まず信号鎖は全体的にRNAであると仮定する。信号鎖がデオキシリボヌクレオチドをも含む実施態様は自明である。

米国特許出願第607,885号の場合のように信号鎖の少なくとも一部が相補的塩基対合により、標的結合領域と少なくとも一部は共通である（好ましくは全体が標的結合領域内に含まれる）プローブポリヌクレオチド部分に結合している。この対合によりこのセグメントおよび信号鎖全体が消化から保護されるべきである。従つて消化が前進性の酵素、たとえばポリヌクレオチドホスホリラ

ーゼである場合、この対合は信号鎖の3'末端を含むべきである。この3'末端の対合によつて、信号鎖全体がこの種の前進性酵素による消化に対して保護される。

即前進性の消化酵素を単独で、または前進性の消化酵素と組合わせて使用してもよい。この種の酵素が信号鎖リボヌクレオチドセグメント（末端にないセグメントをも含む）を消化しうる場合、普通は信号鎖のリボヌクレオチド部分全体が試薬複合体において相補的塩基対合により結合していること、特にプローブポリヌクレオチドのヌクレオチドに結合している必要がある。しかし前進性の消化酵素のみを用いる実施態様に関しては、信号鎖の一部（大きな部分であることが適切である）が一本鎖状のリボヌクレオチドであつてもよい。信号鎖の3'末端は結合しているので、信号鎖のこの一本鎖セグメント（すなわち遊離セグメント）は普通は、相補的塩基対合によりプローブポリヌクレオチドに結合している対合セグメント（PS）よりも信号鎖頭部に近い方（すなわち3'末端付近）

にある（第1Aおよび4A図参照）。このように本発明の多くの実施態様においてプローブポリヌクレオチドPはDNAであり、信号鎖SSはRNAであり、信号鎖の対合セグメント（PS）は相補的塩基対合によつて、プローブポリヌクレオチドPの標的結合領域TBRの一部である（かつ好ましくはその末端にある）信号鎖結合領域LBRに結合している。

本発明の他の形態においては、プローブポリヌクレオチドは試薬複合体中において、後記の消化酵素または消化工程による消化に対して保護されたRNAである。たとえば前進性酵素を用いる実施態様を考えると、RNAプローブポリヌクレオチドの3'末端は試薬複合体において遮断されていなければならない。ある形の遮断はプローブポリヌクレオチドを置換後も前進性酵素による消化から保護し続けるであろう。この形態には共有結合した環状の、すなわち3'ヘアピン状RNAプローブポリヌクレオチド（従つて遊離3'末端を含まない）、ならびに3'末端が化学的に調導体化されるか（た

たとえば末端3'-水酸基へのリン置付加により、または過ヨウ素酸塩による酸化ののち水酸化ナトリウムで置元することにより）、3'末端がデオキシリボヌクレオチドで延長されるか、または支持体に付着することにより調導体化されたRNAプローブポリヌクレオチドの使用が含まれる。しかしRNAプローブポリヌクレオチドの3'末端が試薬複合体において、信号鎖の対合セグメントへの相補的塩基対合のみによつて遮断されていることが好ましい。たとえば別個のRNAプローブポリヌクレオチドを別個の信号鎖に、それぞれの3'末端が相補的塩基対合によつて他方のヌクレオチドに結合する様式でハイブリッド形成しうる。この種の試薬複合体を第4A図に示す。あるいはプローブポリヌクレオチドの3'末端がそれ自身上へループ状に逆転してハイブリッド形成し、これにより信号鎖およびプローブが連続したポリヌクレオチド（特に連続したRNAポリヌクレオチド）の一部であつてもよい。この種の試薬複合体を第3A図に示す。この実施態様においては、プローブポリ

特開昭62-21062(7)

ヌクレオチドは3'末端を含まず、対合セグメントPSが標的結合領域TBRの信号鎖結合領域LBRから発検されると、特選型酵素は対合セグメント全体を消化し、中間セグメントIS（これは信号鎖またはプローブヌクレオチドの一部、またはそれぞれの一部と考えられる）全体を消化し、次いで（場合により）標的結合領域全体を消化するであろう。

本発明の試薬複合体およびキットを使用する際には、また本発明方法によれば、被分析試料を濃縮し、処理してそのDNAを検出可能な形に変える。まず音波処理、抽出その他の物理的または化学的処理によつてDNAを組織（細胞、ウイルス）から放出させ、次いで被検成分を濃縮することが望ましい。本発明のある形態においては、試料DNAを無作為に、もしくは特定の位置で切断し（たとえば制限酵素により）、および/または変性することができ、処理法の例にはドブソル硫酸ナトリウム（SDS）もしくはテオシアン酸ジアニジウムによる変性、強アルカリ処理、蛋白質分解、リボスクレアーゼ処理、フェノール抽出、またはこれら

のある種の組合せが含まれる。本発明に関しては内原RNAを除くことが望ましく、また内原ADPおよびATP（ある形態の本発明においては内原AMPも）を除くことが望ましいであろう。内原RNAはアルカリ性条件（たとえばNaOH）により除去でき、これにより二重らせんDNAも変性される。内原ATP、ADPおよびAMPは所望により酵素によつて消費できる（たとえばホスファターゼまたはピロホスファターゼを用いる。これらはこの工程ののち不活化および/または除去される）。しかし米国特許出願第729,503号明細書に記載されるように、内原RNAが除去されると、ある形態の本発明においては内原ATP、ADPおよび（ある形態においては）AMPを、本発明の他の形態の場合のように化学的、生化学的または物理的方法を採用してではなく、既知のバックグラウンド値として処理する（従つてこれらを数学的に処理する）ことができる。

塩基処理は内原RNAを処理するための特に好ましい形態である。ヌクレオチドへの変換が不十分

であつたとしても残存するポリリボヌクレオチドは一般に3'末端リン酸を含むからである。PNPは3'末端リン酸を含むポリリボヌクレオチドをヌクレオシドニリン酸に変換する活性をほとんど持たない。

採用できる抽出法のうちではボロネート（boronate）による抽出法が好ましい。これらは隣接水酸基を含む分子（たとえばRNA、リボヌクレオシドおよびリボヌクレオシドニリン酸類に存在する）を捕獲するが、DNAは溶出させるからである。

試料がこうして調製されると、これを本発明の試薬複合体と混合する。その後、分離する必要があるため、この混合または接触は全体として溶液中で行うことが好ましい。しかし、これよりも好ましくはないが本発明のある形態においては試料被検および試薬複合体のうち一方または両方を固相上に固定化する。成核反応（nucleation）（試料被検の標的ヌクレオチド配列がプローブポリヌクレオチドの標的結合領域にハイブリッド形成する初期の反応）の機構は、米国特許出願第607,885

号明細書に記載されたもの、あるいは米国特許出願第684,305号明細書（エム・コリンズら、1984年12月20日出版、審査中）に記載された機構のいずれかであると思われる。コリンズらの上記明細書に記載された組織変換蛋白質の不在下では、成核反応は普通は試薬複合体のプローブポリヌクレオチドの初期結合領域IBRにおいて起こるであろう。この種の成核反応は米国特許出願第684,308号明細書（ジエイ・アイ・ウィリアムズら）に記載の容積排除型ポリマー（たとえばポリ（エチレンオキシド））により、あるいは米国特許出願第684,305号明細書（エム・コリンズら）に記載の蛋白質により、または後記のDNA/DNAらせん型促進剤（ネトロブシンまたはダイスタマイシンA）により促進できる。置換に際して存在するATPは*reo A*蛋白質が有効であるのには不十分である場合、ATP依存性でない他の蛋白質、たとえばG_{ens} 32蛋白質（ポリアミド補助因子を含む）、または大腸菌の一本鎖結合蛋白質がなかな有用であろう。たとえばエス・シー・コウルチコ

特開昭62-21062(8)

フスキー (S.C.Kowalowsky) らの "ジ・エンザイムズ", メル巻, 373-444 頁 (1981) を参照されたい。さらに、糖質の消化により生成した ADP がリン酸化されて ATP となり、これが ADP 産生を伴う置換 (rec 蛋白質により加水分解された ATP から、また置換された鎖から誘導された ADP から) の促進に際して rec A を活性化するカスケードも考慮される。

初期結合領域 IBR におけるこの成核反応に続いて、標的結合配列とプローブポリヌクレオチドとの二本鎖形成が信号鎖結合領域 LBR 内へと移行する。米国特許出願第 607,885 号明細書の 1A-1E に関連してより詳細に記載されたように、信号鎖結合領域 LBR 内で鎖解離の現象 (そこにはジッパー開閉反応 (zipping/unzipping) と記載されている) が起こると思われるが、一般にはごく短期間内に標的ヌクレオチド配列が信号鎖の対合セグメントをプローブポリヌクレオチドの標的結合領域から全体的に置換するであろう。信号鎖がプローブポリヌクレオチドと別個のポリヌクレオチ

ドである場合、この時点でこれは全体的にプローブポリヌクレオチドから離脱するであろう。しかしプローブポリヌクレオチドと信号鎖が連続したポリヌクレオチドの一部をなしている場合、共有結合は残存するであろうが、信号鎖を含む部分の連続鎖は全体として一本鎖状に変換されるであろう。

プローブポリヌクレオチドが DNA であり、信号鎖対合セグメントが RNA である本発明の実施態様においては、置換に際して RNA と DNA の二重らせんよりも DNA と DNA の (すなわち標的ヌクレオチド配列とプローブポリヌクレオチドの) 二重らせんの形成の方を促進する追加の試薬を用いることが考慮される。この種の促進剤にはネトロブシンおよびジスチマイシン A が含まれる。この種の促進剤は特に本発明および米国特許出願第 729,503 号の発明に有用であるが、これらは RNA 信号鎖または標的ポリヌクレオチドを DNA プローブポリヌクレオチドから、標的ヌクレオチド配列を含む DNA 競合体 (試料) によって置換するいずれの場合

合にも使用できる。

この置換反応の結果、RNA 信号鎖ポリヌクレオチドが溶液中へ放出されるか、またはそれらの 3' 末端が遊離する (あるいは他の形で消化可能となる)。そこでこれらは消化され、消化生成物アブソシンリン酸が後記に従って測定される。

しかし本発明のある形態においては、置換反応を受けた試薬複合体の標的結合領域 TBR もアデノシンリン酸として作用する可能性がある。このような標的結合領域 TBR は、置換反応後には DNA 標的ヌクレオチド配列と DNA/RNA (または A) 二重らせん構造を形成していることは認められるであろう。これは標的結合領域がポリヌクレオチドセグメントである場合にのみ適用され、標的結合領域がデオキシリボヌクレオチドセグメントである場合には適用されないであろう。この種の RNA/DNA らせんの消化は以下のように行われる。エンドヌクレアーゼ II のリボヌクレアーゼ H (RN アーゼ H) 活性をもつ酵素を存在させ、または添加して、上記の DNA/RNA または "A" らせんの

一部である RNA セグメントを選択的に消化することができ。これはエンドヌクレアーゼ II であるため、これは一般に RNA 標的結合領域を切断して、遊離 3' 水酸基をもつ一連の短いリボヌクレオチドにするであろう (一般にヌクレオチド 6~10 個の長さ。この長さは RN アーゼ H 消化パラメーターにより制御される)。適宜な温度および濃度の条件下では、これらの短いリボヌクレオチドは自然に DNA 標的ヌクレオチド配列から会合解除されるであろう。これらのオリゴリボヌクレオチドは離脱すると置換された信号鎖ポリヌクレオチドと同じ様式で後記のように消化される。従ってポリヌクレオチドホスホリラーゼを消化工程に用いる場合、こうして遊離した標的結合領域のオリゴリボヌクレオチドおよび置換された信号鎖ポリヌクレオチドを共に前進的に消化してリボヌクレオシリン酸にするであろう。RN アーゼ H による消化がすべてまたは実質的にすべての標的結合領域のヌクレオチドを標的ヌクレオチド配列から会合解除するのに十分である場合、標的ヌクレオチド

特開昭62-21062(Θ)

配列は他の試薬複合体分子の初期結合領域に成核反応しうる状態となり、置換工程が繰り返される。しかし若干の部分のRNA標的結合領域がDNA標的ヌクレオチド配列に付着したままであつても置換はな可能であり、この場合、置換によつて信号鎖ポリヌクレオチドが第2試薬複合体から置換され、かつ残存オリゴポリヌクレオチド片が標的ヌクレオチド配列から置換される。

上記のようにRNアーゼH活性を用いて本発明の置換アッセイ法による信号を増強することは、遊離3'末端を含まないプローブRNAを用いて試料DNAとの“A”形らせんを形成するハイブリッド形成(置換ではない)アッセイ法にも適用できる。この種のアッセイにおいては、プローブ/試料ハイブリッド形成が起こつた場合に(起こつた場合のみ)、PNP消化性RNA(遊離3'末端を含む)がRNアーゼH開裂によつて生成する。

本発明の消化工程においては、置換反応が起こつた場合に(起こつた場合のみ)少なくとも信号鎖ポリヌクレオチドが(および前記のように標

3'末端に付着し、一般に3'末端が末端OHをもちかつ一本鎖であるリボヌクレオチドのみを攻撃するであろう。しかし、消化されるリボヌクレオチドセグメント全体が一本鎖である必要はない。ただし存在する二本鎖(特に内部対合)は十分に短かく、またこれらが一本鎖であるときリボヌクレオチドホスホリラーゼがこれらのセグメントを前進するのに十分な頻度で会合解除しなければならぬ。

主な消化酵素が前進性である(たとえばPNPまたはSVP)本発明のある種の好ましい形態においては、他の消化酵素が存在してもよい。この種の他の消化酵素はたとえば置換された信号鎖の内部対合により形成される可能性のある短いRNA/RNAらせんセグメントに対して選択的なものである形のものであり、その例にはコブラ毒RNアーゼ、ラット肝アルカリRNアーゼI、および大腸菌RNアーゼIIが含まれる。この種の補助消化酵素は末端3'水酸基を後続の前進性酵素による攻撃のために残しておくべきであり、アデノシンの5'炭素における結合

合によりプローブポリヌクレオチドも)消化される。この種の消化は大腸菌RNアーゼIIまたはラット肝アルカリRNアーゼIなどの酵素によつて行われる。これらは一本鎖のリボヌクレオチドセグメントを攻撃し、これらのセグメントをリボヌクレオチドニリン酸(アデノシンニリン酸(AMP)を含む)に変える(リボヌクレオチドニリン酸に関するこれおよび以下の記述はすべて5'-リン酸を意味するものと解すべきである)。しかし3'末端から前進的に進行する消化工程のための酵素(たとえば核酸ホスホジエステラーゼ)を用いること、特にリボヌクレオチドニリン酸(アデノシンニリン酸(ADP)を含む)を産生する前進性酵素を用いることが好ましい。アデノシンニリン酸を産生するこれらの前進性酵素は、これらがリン酸部分を溶液中で無機ホスフェートから各3'末端ヌクレオチドへ転移させて対応するリボヌクレオチドニリン酸を形成するので、一般にポリリボヌクレオチドホスホリラーゼ(PNP)として知られている。これらの酵素は一般にリボヌクレオチドセグメントの

を開裂しないことが好ましい(両条件をコブラ毒RNアーゼは満たす)。この種の補助消化酵素は一般に標的結合領域がDNAである場合にのみ用いられる。他の場合にはこの第2の酵素が無傷の試薬複合体のRNA/RNAセグメントを開裂し、偽信号を発生すると思われるからである。

3'末端に対して選択的な前進性酵素が得られるならば、3'末端ヌクレオチドが相補的塩基対合によつてプローブの標的結合領域に結合した信号鎖ポリヌクレオチドセグメントを用いて試薬複合体を構成することができであろう。そのキットおよび方法は適宜3'末端を3'末端に変更した前記のものに相当するであろう。この種のキットの候補となる酵素は大腸菌RNアーゼVである。これは活性のために原核生物蛋白質合成酵素を必要とするが、RNAを3'末端から3'末端へ前進的に消化する。

この消化工程によりADP(または場合によりAMP)が生成すると、これは好ましくはピルビン酸キナーゼまたはクレアチンキナーゼなどの酵素

特開昭62-21062 (10)

反応によつてリン酸化されてATPとなる。この種の反応には適宜な高エネルギーリン酸系の補助因子（有機ホスフェート）を伴う（それぞれホスホエノールビルビン酸およびクレアチンリン酸）。その後のATPまたは副生物（たとえばビルビン酸）の検出は米国特許出願第729,502号および第729,503号明細書の記載に従つて行うことができる。

これらの明細書中により十分に記載されるように、上記リン酸化に用いられる酵素および有機ホスフェートはPNPによる消化に際して存在して、さもなければ可逆的であるPNP反応を消化終了の方向へ駆動することが好ましい。このリン酸化に際して生成するATPは一般的検出手段のいずれによつても検出でき、これにはたとえばルツフェリンを用いる発光性ルツフェラーゼ触媒反応が含まれる。あるいはリン酸化工程の副生物（特にビルビン酸）を一般的手段により測定することができ、これにはたとえばNADHを用いる乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)触媒反応によるビルビン酸の測定が

含まれる。これらの場合、NADHの消失を追跡することにより（光化学的に、または蛍光により）、消化工程により生成したADPと、従つて試料の複製(DNA)中の標的ヌクレオチド配列の存在および量と関数関係にある値が得られる。これらの検出工程についても米国特許出願第729,502号および第729,503号各明細書中により詳細に記載されている。

方法および試薬複合体に関する上記の記述に基づいて、本発明による試薬キットの種々の形態が明らかになるであろう。たとえば下記の要素が一般に試薬キット中に存在する。

- A. 試薬複合体、
- B. 消化酵素（補助因子を含む）、
- C. リン酸化酵素（補助因子および補助反応体を含む）、
- D. 検出システム。

本発明の多くの形態において、置換助剤、たとえばポリエチレングリコール（米国特許出願第654,308号明細書参照。ジエイ・アイ・ワイリ

アムズら、1984年12月20日）または組換え蛋白質、たとえば大腸菌からの rec A 蛋白質（前記で引用した米国特許出願第654,308号明細書に記載、コリンズら）も使用できる。ただしATP依存性酵素（たとえば rec A 蛋白質）を用いて置換を促進する場合、補助因子として導入されたATPはいずれも置換後に、かつ消化前に除去されるかまたは補償されなければならない。

前記のように最初のADP産生（置換された標的の消化による）、ATPへの誘導、 rec A 活性化（副生物ADPからATPへの再リン酸化を伴う）、および置換の促進によりカスケードを生じることができ、

これらの成分の一定の組合せを一緒に包装することが好ましい。別個に包装する場合はこれらを一緒に反応混合物に導入することが好ましい。この組合せには特にリン酸化酵素（その補助因子を含む）および消化酵素（特にポリヌクレオチドホスホリターゼ）が含まれる。AMPを産生する消化酵素を用いる場合（蛇毒ホスホリエステラーゼ）、

この消化酵素は普通はそれ自身不可逆的に消化するので、一般にはリン酸化酵素をこの消化酵素と共に包装する必要はない。しかしこの場合、2種のリン酸化酵素（補助因子を含む）を一緒に包装するかまたは一緒に導入することが好ましい。たとえばヌクレアーゼおよびビルビン酸キナーゼを一緒に包装するか、または一緒に導入する（それぞれ適宜な補助因子および補助反応体、たとえばCTPおよびホスホエノールビルビン酸を含む）。

さらに本発明のある形態においては、酵素の貯蔵に際して非特異的に生成するATPを使用中に妨害信号を与えない形（特にアデノシンおよび無機ホスフェート）に変えるために、ATPアーゼ、アピラーゼ、ホスファターゼまたはピロホスファターゼを1または2以上の成分中に組み合わせて低い濃度で存在させることも考慮される。特にこの種の酵素をリン酸化酵素および検出システム用試薬中に含有することが考慮される（LKBはこの種のATPアーゼを同様な理由からルツフェラーゼ試薬中に含有する）。ボロネートおよび他のヌクレオ

特開昭62-21062 (11)

シドリン酸燐化剤を同じ目的に用いることもできる。

第1図(第1A、1Bおよび1C図からなる)は本発明の3'末端不斉の第1の形態を示す。第1A図にはDNAプローブポリヌクレオチドPおよびRNA信号鎖ポリヌクレオチドSSを含む試薬複合体が示されている。この形態においては、プローブポリヌクレオチドPの主要部分は分析すべき標的ヌクレオチド配列に相補的な標的結合領域TBRである。標的結合領域TBRの一部である初期結合領域IBRは試薬複合体において一本鎖である。標的結合領域TBRの他の部分、すなわち信号鎖結合領域LBRは相補的塩基対合によつて信号鎖SSのセグメントである対合セグメントPSに結合している。信号鎖SSについてみると、対合セグメントPSは尾部(3'末端に最も近い部分)を占め、遊離セグメントFSは頭部(3'末端に最も近いセグメント)を占める。使用する際には、核酸(特に試料DNA)を含む試料とこの試薬複合体を接触させる。標的ヌクレオチド配列を含む試料DNA片G

が第1A図に示す試薬複合体と接触すると、これはまず初期結合領域IBRにおいてハイブリッド形成しうる。

第1B図は信号鎖SSがプローブポリヌクレオチドの標的結合領域TBRから試料核酸鎖Gによつて置換される中間段階を示す。この中間構造において信号鎖の3'末端(実際には対合セグメントPSの一部)はプローブポリヌクレオチドから置換されているが、信号鎖SSは相補的塩基対合によつてプローブポリヌクレオチドの3'末端近くの部分の標的結合領域TBRに結合したままである。米国特許第5,078,885号明細書に記載した機構によつて、本発明の第1B図に示した構造は、信号鎖SSがプローブポリヌクレオチドPから解離する地点まで左右にジッパ開閉作用を受けるであろう。第1C図は試料核酸鎖Gの標的ヌクレオチド配列とプローブポリヌクレオチドPの標的結合領域TBRとの間で置換終了後に形成されるDNA/DNAハイブリッドを示す。信号鎖SSはこの時点では置換されて、一本鎖状態で溶液中に存在する。同様

に第1C図に示されるように、酵素ポリヌクレオチドホスホリラーゼ(PNP)は信号鎖SSの3'末端に付着し、このRNA信号鎖を3'末端から前端的に消化する。この実施態様においては、ポリヌクレオチドホスホリラーゼは対合セグメントPS全体を前端的に消化し、次いで信号鎖SSの遊離セグメントFS全体を前端的に消化する。第1C図に示されるように、この消化によつて信号鎖ポリヌクレオチドのリボヌクレオチドすべてがヌクレオシドニリン酸として離脱しうる。これはADP以外のヌクレオシドニリン酸エ塩(εNDP)およびアデノシンニリン酸γ個(γADP)として示される。十分な量のピルビン酸チナーゼおよびホスホエノールピルビン酸が存在する限り、γ分子のPEPがγ分子のADPと反応して(ピルビン酸チナーゼにより触媒される)γ分子のATPおよびγ分子のピルビン酸を生成する反応が起こるであろう。本方法においては、こうして生成したATPまたはこうして生成したピルビン酸のいずれかが検出される。こうして検出された量は、試薬複合体から置換さ

れた信号鎖ポリヌクレオチドの数と関数関係にあり、この数は試料の核酸中に存在していた標的ヌクレオチドセグメントの量と関数関係にあるであろう。

第2A、2B、2Cおよび2D図は本発明の試薬複合体の他の形態4種を示す。これらはそれぞれ第1A図に示した試薬複合体と同様に、DNAプローブポリヌクレオチドPおよびRNA信号鎖ポリヌクレオチドSSを含む。第2A図に示した形態の場合、信号鎖ポリヌクレオチドはプローブポリヌクレオチドPの5'末端に最も近い位置において、プローブポリヌクレオチドPの標的結合領域の一部(信号鎖対合領域LBR)に結合する対合セグメントPSを含む。従つて標的ヌクレオチド配列によるハイブリッド形成は、普通は信号鎖結合領域LBRよりも3'末端に近い方にある初期結合領域IBR内においてまず行われるであろう。従つて信号鎖ポリヌクレオチドSSの3'末端は置換反応が終結して初めて置換されるであろう。従つて第1B図に示すように置換は終結していないが信号鎖ポリヌ

特開昭62-21062 (12)

クレオナドSSの遊離3'末端が一本鎖状であり従って消化されうる構造は存在しない。これら2種の形態を比較すると、第1図の形態は置換反応の途中で消化が進行し、置換反応を終結の方向へ駆動するのを助けるという利点をもつ。しかし第2A図の形態は、標的ヌクレオチド配列(その3'末端ではない)に隣接する試料被置換のため消化が起らないであろうという利点をもつ。

第2B図に示した試薬複合体の形態(実施例で用いた型である)においては、信号鎖ポリヌクレオチドSSは試薬複合体においてプローブポリヌクレオチドPの信号鎖結合領域LBRに結合したヌクレオチドのみを含む。従ってこの試薬複合体は信号鎖ポリヌクレオチドセグメントを攻撃する消化酵素(たとえばラット肝アルカリRNアーゼI)と組合わせて使用できる。使用に際しては、この種の試薬複合体はまず初期結合領域IBRにおいて標的ヌクレオチド配列とハイブリッド形成しうる。次いで信号鎖結合領域LBR全体にわたる連鎖置換が起こり、その結果信号鎖ポリヌクレオチドSS

がプローブポリヌクレオチドPから解離する。消化酵素がリボヌクレオチドニリン酸を産生するならば、消化およびリン酸化は第1C図に示すように進行するであろう。消化酵素がリボヌクレオチドニリン酸を産生する場合、米国特許出願第729,502号および第729,503号各明細書(前記で引用)に、AMPがリン酸化される形態に関して記述されるように、リン酸化は普通は2工程で行われるであろう。

第2D図に示す第4の形態の試薬複合体は、そのヌクレオチドが完全にプローブポリヌクレオチドPの標的結合領域TBRの信号鎖結合領域LBRに結合した信号鎖ポリヌクレオチドSSを含む。しかし信号鎖結合領域LBRは標的結合領域TBRの末端ではなく、むしろその中央に位置する。従って2つの初期結合領域IBR-1およびIBR-2がプローブポリヌクレオチド内に存在する。従って標的ヌクレオチド配列によるハイブリッド形成はまずIBR-1またはIBR-2のいずれかにおいて行われ、最後に信号鎖ポリヌクレオチドSSが信号鎖

結合領域LBRから置換される。このような場合の置換は米国特許第684,305号明細書の例4に実験的に証明されており、可能性のある機構は米国特許出願第606,885号明細書の第1F図に関連して記述されている。第2C図の信号鎖ポリヌクレオチドは置換されると消化およびリン酸化を受け、次いで前記実施形態と同様に検出される。

第2D図はDNAプローブPが検出される標的ヌクレオチド配列に対し相補的な標的結合領域TBRを含むという点では第2B図のものと類似の試薬複合体を示す。セグメントTBRの3'末端に一本鎖状の初期結合領域IBRがあり、これにより第2B図の場合のように標的ヌクレオチド配列による置換が促進される。

第2D図のプローブPの信号鎖結合領域(LBR)には相補的な塩基対合によつて一連の信号鎖(信号鎖SS-1、SS-2、SS-3、SS-4およびSS-5と示される)が結合している。実際にはこれら複数の信号鎖は第2B図の試薬複合体を緩和に(短時間、低い酵素濃度において)RNアーゼHで処理するこ

とによつて形成される。この処理によつて第2B図の信号鎖SSはランダムに切断され、断片SS-1、SS-2、SS-3、SS-4およびSS-5が生成するであろう。プローブPへの結合がゆるすぎる断片はいずれも使用前にクロマトグラフィーにより除去することが望ましいであろう。第2D図に示すように断片SS-1~SS-5がすべて完全に結合しているが、若干の断片が3'末端セグメントのみにおいて結合した試薬複合体も、たとえば第1A図または第2A図の試薬複合体を緩和にRNアーゼH消化することによつて得られる。

使用に際しては、第2D図の試薬複合体を標的ヌクレオチド配列と接触させると、DNA/DNAハイブリッドがまず初期結合領域IBRにおいて形成され、次いで順次信号鎖結合領域LBR全体に形成される。DNA/DNA二重らせんがLBRにおいて形成されるのに伴つて、信号鎖SS-5、次いでSS-4、次いでSS-3、次いでSS-2、最後にSS-1が置換されるであろう。後続の工程でそれぞれ消化されてヌクレオチドリン酸類となり(ADPまた

特開昭62-21062 (13)

はAMPを含む)、AMPまたはADPが前記のようにリン酸化される。

第3A図は本発明の試薬複合体の第6の形態を示す。この場合、プローブポリヌクレオチドおよび信号鎖ポリヌクレオチドが連続したRNAポリヌクレオチド鎖の一部である。この鎖の5'末端から前方へ、検出されるDNA標的ヌクレオチド配列に相補的な標的結合領域TBR、中間セグメントIS、および3'末端に結合セグメントPSが示される。結合セグメントPSは標的結合領域TBRの一部(信号鎖結合セグメントLBR)に相補的であるので、これは試薬複合体においてRNA/RNA二本鎖部分を形成する。標的結合領域(この形態では標的結合領域TBRの5'末端として示されている)の他の部分(初期結合領域IBR)は一本鎖状である。この種の試薬複合体の製造については米国特許出願第729,504号明細書(イー・エフ・フリッテおよびエム・コリンズ、1985年5月2日出願、ジエネティクス・インスティテュート社に譲渡)に記載されている。

リヌクレオチドの消化されなかつた残部には、試料鎖Gの標的ヌクレオチド配列TNS(デオキシリボヌクレオチドセグメントである)に結合した標的結合領域TBR(リボヌクレオチドセグメントである)が含まれるであろう。

本発明のある形態においては、この結合セグメントPSおよび中間セグメントISの消化によつて生成する n ADPのみを次いでリン酸化し、検出する。しかし本発明の他の形態においては、リボヌクレアーゼH(RNアーゼH)が存在し、あるいはこの時点で添加され、RNA/DNA二重らせんのRNAのみを選択的に消化するであろう。これを第3C図の標的結合領域TBRを指す矢印により図示する。第3D図は標的結合領域TBRに対するRNアーゼHの作用によつて生成する可能性のあるRNAオリゴヌクレオチドを示す。これらはそれぞれ一本鎖状で解離するのに十分なほど短く、第3D図に示すようにポリヌクレオチドホスホリラーゼPNPにより消化されて、ADP以外のヌクレオチドニリン酸 p 分子(p NDP)およびアデノシンニ

第3A図の試薬複合体は、適宜な標的ヌクレオチド配列TNSを含む試料DNA核酸鎖Gと接触すると、第1Bおよび1C図に関連して先に述べたものと同様な様式で成核および連鎖置換を行うであろう。連鎖置換が終了した時点で、第3B図に示す中間構造が形成されているであろう。この構造においては、連続RNA鎖の標的結合領域TBRはRNA/DNA二本鎖の形で試料DNAポリヌクレオチド鎖Gの標的ヌクレオチド配列TNSに結合しているであろう。RNAポリヌクレオチドの残部(中間セグメントISおよび結合セグメントPSを含む)はこの二本鎖に結合してはいるが、一本鎖状であろう。この時点で前進性の消化酵素(ポリヌクレオチドホスホリラーゼPNP)はRNA鎖の遊離3'末端(結合セグメントPSの3'末端)に付着し、結合セグメントPSおよび中間セグメントIS全体を消化することができる。この消化が終了すると、第3C図に示すようにADP以外のヌクレオチドニリン酸 n 個(n NDP)およびアデノシンニリン酸 n 個(n ADP)が生成するであろう。プローブポ

リン酸(q ADP)を生成する。

第3E図は第3C図に示した消化により生成したアデノシンニリン酸(n ADP)および第3D図に示した消化により生成したアデノシンニリン酸(q ADP)の双方のリン酸化を示す。十分量のビルビン酸キナーゼおよびホスホエノールビルビン酸(PEP)を用いると、($n+q$)PEPおよび($n+q$)ADPが消費され、($n+q$)ビルビン酸分子および($n+q$)ATP分子が生成する。これらの生成物のいずれも検出できる。

さらに試料鎖Gはここで第2の試薬複合体にハイブリッド形成しうる。

前記第2D図に関して、試薬複合体はたとえば第2B図の信号鎖SSをRNアーゼH(DNA/RNA二重らせんのRNA鎖に特異的である)で消化することにより形成された複数の信号鎖SS-1~SS-5を含むものとして記述された。本文に示したように、置換後の信号鎖SSまたは結合セグメントPSにおいて生成する可能性のあるRNA/DNA二重らせんを消化する酵素を用いてもよい。ただし

特開昭62-21062 (14)

DNAプローブポリヌクレオチドを用いる第1A、2A、2B、2Cおよび2D図の形態についてである。ここで用いる酵素（特に補助消化酵素として）の例はコブラ RNアーゼである。

第4A図はプローブポリヌクレオチドPおよび信号鎖SSがそれぞれRNAである第7の形態を示す。対合セグメントPSが信号鎖SSの5'末端を含む。信号鎖結合領域LBRはプローブポリヌクレオチドPの3'末端を含む。対合セグメントPSは相補的塩基対合により信号鎖結合領域LBRに結合しているため、同鎖とも筋道性のみの消化酵素による攻撃から保護されている。一本鎖セグメントPSおよびTBRは末端を含む。

置換およびPNPによる消化を行うと、前記実施例の場合のように信号鎖SS全体が消化されるであろう。RNAプローブポリヌクレオチドPはこの段階では強制的ヌクレオチド配列TNSを保有する試料DNAに結合しているであろう。ここで、先に第3Cおよび3D図に関連して記述した様式でさらにRNアーゼH、次いでPNPによる消化が行わ

れ、さらにADPが生成する。ADPの検出はこの実施例においても前記実施例の場合と同様に行われる。

本発明を下記の実施例によりさらに説明する。

実施例 1

RNA 信号鎖の製造

ヌクレオチド52個の長さの合成RNAを下記に従って構成した。pSp 64 DNA 10 μ g を Eco RI エンドヌクレアーゼによる制限によつて線状化した。このDNAをフェノール、クロロホルムおよびイソアミルアルコール(25:24:1)の混合物で1回抽出した。水相と有機相を分離し、有機相を等容積のTE(トリス塩酸10 mM、pH 8.0; EDTA 1 mM)緩衝化した0.2 M・NaClで再抽出したのち、プールした水相をジエチルエーテル飽和した水で3回抽出し、エチルアルコールを75% (V/V)にまで添加することによりDNAを再沈殿させた。この鉤型から下記に従つてRNAを製造した。各反応混合物(各成分はプロメガ・バイオテック社より)はトリス塩酸40 mM (pH 7.5)、MgCl₂ 8 mM、スベルミ

ン2 mM、NaCl 10 mM、ジチオスレイトール10 mM、4種のrNTPそれぞれ500 μ M、RNA シンセターゼ60単位、 α [³²P] γ -ATP 10~50 Ci、およびEco RI 線状化pSp 64 DNA 2 μ g を含有していた。反応はSP6ポリメラーゼ45単位を最終容積50 μ l中に添加することによつて開始した。37℃で60分間インキュベートしたのち、さらにRNAシンセターゼを60単位およびDNアーゼIを2単位添加し、37℃でさらに15分間インキュベーションを続けた。塩濃度を4 M・NaClで400 mMに調整したのち、反応物を線状化DNAについて先に記述したように抽出した。フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール抽出した水相を1.5 mlセファブックスG-50 スピニングカラム上で遠心分離することによりヌクレオチドを定量的に除去した。G-50画分をポリエチレンイミンスルロースクロマトグラフィー処理、次いでセレンコフによる α [³²P] ATPの計数により判定したヌクレオチド除去率は99.5%以上であつた。

RNA-DNA ハイブリッドの製造

特定のRNA製剤を種々の量の相補的「プローブ」DNAで滴定し、ハイブリッドにRNAとして90~95%の放射能が取り込まれるのに必要な投入DNAとRNAの比を調べた(アガロースゲル電気泳動により判定)。一定量の52-mer RNAを数種の濃度(0.01~0.1 μ g/ μ l)のM13 mp11一本鎖環状DNAに、0.2 M・NaClおよびTE緩衝液の存在下でハイブリッド形成させた。反応物を65℃で30分間インキュベートしたのち、反応物を冷却し、ハイブリッド形成度をアガロースゲル電気泳動により定量し、次いで切断して遊離52-merおよびハイブリッドバンドを計数した。

置換反応

52-mer:M13 mp11ハイブリッド(試薬複合体)を最終容積10 μ lにおいて、プローブM13 mp11 DNAに対し等量のM13 mp10 複合体DNAの存在下または不在下で、65℃において120分間インキュベートした。プローブDNAと複合体DNAは同分子種であるので、この反応は複合体対

特開昭62-21062 (15)

52-mer 標識プローブと経度 1:1 の比率で懸
続した。

置換された RNA をスクレオチドリン酸塩に変換

置換後の反応物を、蒸留および脱イオンした
DEPC (ピロ炭酸ジエチル) 処理した水で NaCl
0.1 M となるまで希釈し、等容積の 2 × 加リン酸
分解キナーゼ反応混合物を添加した。これにより
NaCl 50 mM、トリス HCl 100 mM (pH 8.5)、2-
メルカプトエタノール 1 mM、MgCl₂ 10 mM、オ
ルトホスフェート 10 mM、ホスホエノールピルピ
ン酸 20 mM、ポリスクレオチドホスホリラーゼ
0.02 単位、およびピルピン酸キナーゼ 1 単位の最
終成分濃度となつた。反応物を 50℃で 60 分間イ
ンキュベートしたのち、ATP、ADP、および消化
不完全な RNA + 無傷の RNA の量をポリエチレンイ
ミンセルロースクロマトグラフィーにより定量し
た。この置換および変換反応の結果を表 1 に示す。

限エンドヌクレアーゼで線状化した。フェノール
抽出後の反応混合物を 1.5 ml のバイオゲル (Bio
Gel) P-6 スピンカラムにより遠心分離すること
により精製した。

ハイブリッドの製造

上記実施例 1 に記載した方法により、M13 mp
11 プローブ含有ハイブリッドに 93% の水準の
総 RNA を取り込ませることによりハイブリッドを
製造した。

置換反応

23-mer RNA: M13 mp11 ハイブリッド (試
験複合体) を用いて実施例 1 の記載と同様にして
複合体 M13 mp10 DNA を検出した。ただし置換反
応を 50℃で 1 時間行つた。使用した他の M13 mp
10 製剤は質量基準で 23-mer ハイブリッドおよ
び 52-mer ハイブリッドの置換において有効性が
より低かつた (ここに示されていない)。

置換された RNA をスクレオチドリン酸塩に変換

ピルピン酸キナーゼおよびポリスクレオチドホ
スホリラーゼを用いる置換反応を実施例 1 に記載

表 1
52-mer RNA ハイブリッドの置換

	ATP への置換		ハイブリッド + 複合体 DNA ²	
	ハイブリッド + ラム DNA ¹ (1:1)		(1:1)	
置換後の 転化時間 (分)	0	60	0	60
総 CPM ³ へ 対する%				
ATP	0.4	0.5	0.6	89.4
ADP	0.6	0.03	0.2	6.3
RNA	99.1	99.4	99.2	4.3

1. ラム DNA は対照非置換 DNA として用いた。
2. ハイブリッドのプローブ鎖は M13 mp11 DNA
であり、複合体は M13 mp10 DNA である。
3. ポリエチレンイミンセルロースクロマトグラフ
ィーによりアッセイ。

実施例 2

RNA の製造

以下の点を除いて上記と同様に 23-mer RNA
の製造を行つた。鎖型 pSp64 DNA を Hinc II 制

したと同様に行つた。複合体 (モル) 対ハイブリ
ッドプローブ鎖 (モル) の相対水準 0.6 および 1
における実験の結果を表 2 に示す。

表 2

複合体/ハイブリッド ¹	0.0	0.6	1.0
遊離 RNA の量 (対・総 cpm) ²	22.3	29.6	43.8
転化した量 (対・総 cpm) ³ :			
ATP	17.6	23.2	38.8
ADP	3.2	6.6	7.8
転化しなかつた量 (対・総 cpm) ⁴	79.2	70.2	53.4

- 数値は相対量のみを表わす。
複合体は DNA M13 mp10 であり、プローブ鎖
は M13 mp11 である。
- アガロースゲル電気泳動によりアッセイ。
- ポリエチレンイミンセルロースクロマトグラフ
ィーによりアッセイ。
- ハイブリッド形成した RNA および長さ 3 以上の
オリゴポリスクレオチド。

実施例 3

RNA の製造

スクレオチド 195 個の RNA の製造を下記にエ
リ行つた。PBR-322 からの 375 BP Eco RI Bam

特開昭62-21062 (16)

HI断片を鎖状化したのちのpSp65 DNA中にEcoRIおよびBamHI各制限エンドヌクレアーゼによりサブクローニングした。誘導体pSp65-15 DNAをEcoRVにより鎖状化したのち、pSp65-15鎖型を4種すべてのヌクレオシド三リン酸(α [32 P] ATPを含む)の存在下で転写することにより長さ195のRNAを製造した。転写後にセファデックスG-50ゲル透過によりRNAからヌクレオシド三リン酸を除去した。

ハイブリッドの製造

上記実施例1に記載した方法により、均一に [32 P] アデノシン標識したRNAを一本鎖M13mp8-20-G DNAハイブリッドに90%の水準まで取り込ませることによつてハイブリッドを製造した。

置換反応

ポリヌクレオチドホスホリラーゼ/ビルビン酸キナーゼ反応に用いた緩衝系から酵素を除いた系において置換反応を行つた。置換、ならびにRNAから信号鎖ADPおよびATPへの転化を同時にかつ

同一溶液中でルーチンに行つた。この実施例の目的のために、置換工程および転化工程を分けることにより置換および転化の各工程の定量化を行うことができる。この反応混合物は実施例1に示した成分のほか195-merとM13mp8-20 DNAとのハイブリッド(試薬複合体) 0.8 pmole、M13mp19 $3\frac{1}{2}$ 複合体 0~7 μ g、または等量のM13mp11 非複合体DNAを最終容積20 μ g中に含有していた。後者のDNAは195-mer RNAが結合するM13mp8-20の領域に相補的な1.1 kbの挿入体を含まない点以外は複合体DNAに等しい。添加したNaCl 0Mまたは0.10 Mにおいて2組の反応を行い、イオン強度が置換、ならびに後続の転化および被分析体DNAと対照DNA(複合体ではない)の検出に与える影響を調べた。置換反応混合物を65℃で30分間インキュベートしたのち、試料を室温に取り出し、種々の量の試薬複合体または対照DNAを示す各反応物4 μ を1.8%アガロースゲル上における電気泳動により、置換度についてアッセイした。次いで各反応混合物に、ポリヌクレ

表 3

置換、転化および検出(標準緩衝液)

試料 No	置換 DNA (μ g)	置換RNA の量 (対・総cpm)	転化した量(対・総cpm)			生物 発光
			RNA	ADP	ATP	
1	0	11.5	94.1	0.8	5.0	37720
2	1.78	41.8	62.8	7.8	29.4	150900
3	3.56	72.3	48.5	10.8	40.8	243800
4	5.34	84.8	54.8	12.1	33.2	345600
5	7.12	86.9	46.	16.1	47.9	452700

表 4

置換、転化および検出(緩衝液+0.1 M・NaCl)

試料 No	置換 DNA (μ g)	遊離 ¹ RNA量 (対・総cpm)	転化した量(対・総cpm)			生物 発光
			RNA	ADP	ATP	
1	0	9.8	94.0	3.0	3.0	23620
2	1.78	60.2	67.3	6.9	25.8	75340
3	3.56	76.8	54.9	10.1	35.0	140800
4	5.34	84.4	65.7	6.0	28.3	187800
5	7.12	88.1	49.6	10.1	40.4	385200

1. アガロースゲル電気泳動により分析。

2. ポリエチレンイミンセルロースクロマトグラフィーにより分析。

オチドホスホリラーゼ約0.028単位およびビルビン酸キナーゼ0.4単位を含む1×PNP/PK緩衝液12 μ gを添加した。この反応混合物を50℃で30分間インキュベートしたのち、各反応混合物4 μ gをPEIセルロースに施した。試料を0.8 M・LiClおよび0.8 M酢酸中でクロマトグラフィー処理したのち、RNA、ATPおよびADPに相当するスポットを切り取り、セレンコフ計数により定量化した。各反応混合物の残りを蒸留した脱イオン水で最終容積250 μ gに調整し、標準試薬を用いて、LKB 1250ルミノメーターで生物発光により定量化した。これらの分析の結果を表3および4に示す。表4の遊離RNAの値9.8%はハイブリッド形成していない割合による(上記の90%というハイブリッド形成効率を留意されたい)。

4. [図面の簡単な説明]

第1図は本発明の第1の実施態様を3部分に分けて(第1A、1Bおよび1C図)示した略図であり、第1A図には試薬複合体、第1B図には置換工程の中間段階、第1C図には置換された信号鎖の消化およびADPからATPへのリン酸化を示す。

第2A図は本発明の第2の実施態様による試薬複合体の略図である。

第2B図は本発明の第3の実施態様による試薬複合体の略図である。

第2C図は本発明の第4の実施態様による試薬複合体の略図である。

第2D図は本発明の第5の実施態様による試薬複合体の略図である。

第3A、3B、3C、3Dおよび3E図は本発明の第6の実施態様の各段階を順次示した略図である。

第4A図は本発明の第7の実施態様による試薬複合体の略図である。

第4B図は信号鎖(もはや図示されていない)

特開昭62-21062 (17)

置換後の第4A図の試薬複合体の略図である。

これらの図面において各記号は下記のもを表わす。

P: プローブ鎖; TBR: 標的結合領域;
IBR: 初期結合領域; LBR: 信号鎖(標識)結合領域;
SS: 信号鎖; PS: 対合セグメント;
FS: 遊離セグメント; IS: 中間セグメント;
G: 試料DNA鎖; TNS: 標的ヌクレオチド配列;
PNP: ポリヌクレオチドホスホリラーゼ;
PEP: ホスホエノールピルビン酸。

特許出願人 フライド・コーポレーション

代理人 弁理士 新 洗 雄
(外5名)

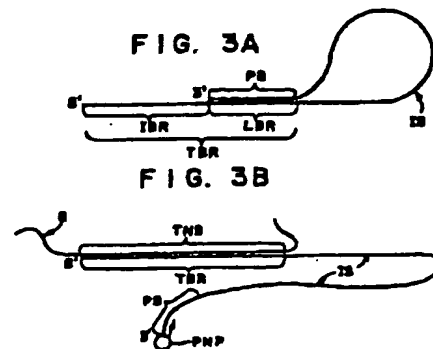
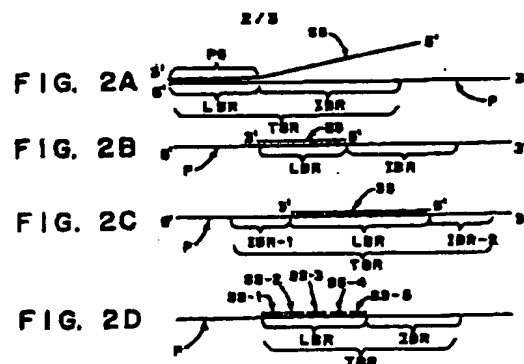
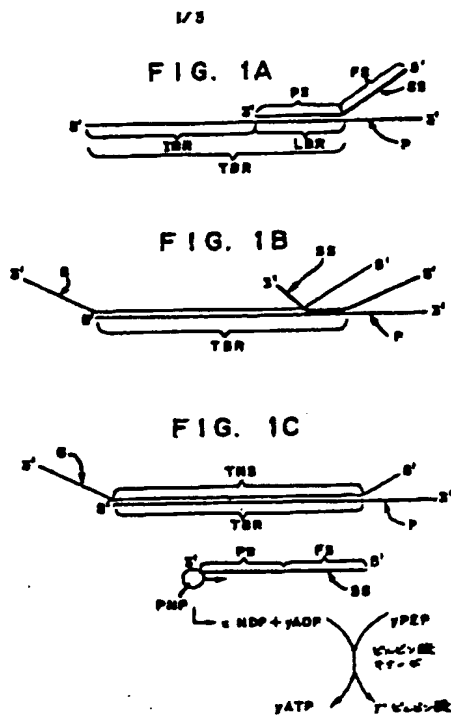


FIG. 3C

